

(1) REP US 3907518; US 4452773; US 4554088; US 4628037; US 4795698; 1.Jnl.Ref; DE 3720844; US 4375407; WO 9007380

IC ICM C12Q001-10; C12Q005-10; G01N031-02; H01F001-06; H01F001-34  
ICS A01N001-02; A61K049-00; B01D035-06; B32B005-16; C01G049-08;  
C12N011-06; C12Q001-68; G01N033-53; G01N033-553

AB WO 9102811 A UPAB: 20030211

(A) a process for making resuspendable coated magnetic particles comprising: (a) forming a liq. mixt. of a particulate magnetic starting material (e.g. magnetite) and a coating material characterised by the ability to form a coating on disrupted particles of the magnetic starting material, (b) treating the mixt. to-subdivide the particles of the magnetic starting material, (c) simultaneously with step (b), permitting the coating material to form a coating on the subdivided particles of the magnetic starting material to form stable, resuspendable coated particles of the magnetic starting material and (d) recovering the resuspendable coated magnetic particles from the liq. mixt.; (B) a process for making a stable suspension of suspendable magnetic particles.

USE/ADVANTAGE - The coated magnetic particles can form stable colloidal suspensions. They can be used as magnetic resonance imaging contrast agents for bioanalytical applications and for industrial bioprocessing. The HGMS can be used for sepn. of colloidal particles having different magnetic susceptibilities or different bioreceptors or for immobilising coated magnetic prods. and doing reactions on the immobilised material, esp. sequential reactions.

FS CPI EPI GMPI

FA AB; DCN

MC CPI: A11-B05; A12-E08; B04-B04A; B04-B04C; B04-C01; B04-C02C; B04-C03;  
B05-A03A; B05-A03B; B11-C08; B12-K04C; B12-M03; D05-H; J01-K02;  
J04-A03

EPI: S03-E07; S03-E14H4; S05-D02X

AN 1991-087292 [12] WPINDEX

CR 1987-108704 [15]; 1991-073555 [10]; 1996-229823 [23]; 1997-192490 [17];  
2001-040119 [05]

DNN N1991-067422 DNC C1991-037126

TI Re-suspendable coated magnetic particles - prepd. by coating subdivided  
particles in a liquid while the subdivided particles are being formed.

DC A96 B04 D16 J04 P73 S03 S05

IN LIBERTI, P A; PINO, M A

PA (IMMU-N) IMMUNICON CORP; (IMMU-N) IMMUNIVEST CORP

CYC 18

PI WO 9102811 A 19910307 (199112) \*

RW: BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

W: AU CA FI JP

AU 9063403 A 19910403 (199125)

FI 9200763 A 19920221 (199221) C12Q

EP 489119 A1 19920610 (199224) EN 51 C12Q001-10

R: AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

JP 05503188 W 19930527 (199326) 9 H01F001-34 <--

EP 489119 B1 19960508 (199623) EN 15 C12Q001-10

R: AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

DE 69026949 E 19960613 (199629) C12Q001-10

US 5597531 A 19970128 (199710) 9 G01N031-02

CA 2060182 C 20000606 (200041) EN H01F001-06

EP 489119 B2 20030102 (200310) EN C12Q001-10

R: AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI LU NL SE

ADT FI 9200763 A WO 1990-US4459 19900814, FI 1992-763 19920221; EP 489119 A1

EP 1990-914444 19900814, WO 1990-US4459 19900814; JP 05503188 W JP

1990-512705 19900814, WO 1990-US4459 19900814; EP 489119 B1 EP 1990-914444

19900814, WO 1990-US4459 19900814; DE 69026949 E DE 1990-626949 19900814,

EP 1990-914444 19900814, WO 1990-US4459 19900814; US 5597531 A CIP of US

1985-784863 19851004, CIP of US 1986-906521 19860916, CIP of US

1988-245351 19880916, US 1989-397106 19890822; CA 2060182 C CA

1990-2060182 19900814, WO 1990-US4459 19900814; EP 489119 B2 EP

1990-914444 19900814, WO 1990-US4459 19900814

FDT EP 489119 A1 Based on WO 9102811; JP 05503188 W Based on WO 9102811; EP

489119 B1 Based on WO 9102811; DE 69026949 E Based on EP 489119, Based on

WO 9102811; US 5597531 A CIP of US 4795698; CA 2060182 C Based on WO

9102811; EP 489119 B2 Based on WO 9102811

PRAI US 1989-397106 19890822; US 1985-784863 19851004;

US 1986-906521 19860916; US 1988-245351 19880916

PCT 4007

⑩ 日本国特許庁(J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-503188

⑬ 公表 平成5年(1993)5月27日

⑭ Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求有	予備審査請求有	部門(区分)
H 01 F 1/34 A 61 K 49/00	S C	7371-5E 8415-4C 9118-2J			7(2)
		G 01 N 24/02		B※	(全9頁)

⑮ 発明の名称 再懸濁可能なコーティングされた磁気粒子及び安定した磁気粒子懸濁物

⑯ 特 願 平2-512705

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)2月21日

⑱ 出 願 平2(1990)8月14日

⑲ 国際出願 PCT/US90/04459

⑳ 国際公開番号 WO91/02811

㉑ 国際公開日 平3(1991)3月7日

優先権主張 ㉒ 1989年8月22日 ㉓ 米国(US) ㉔ 397,106

㉕ 発 明 者 リベルティ、ボール・エイ アメリカ合衆国、ペンシルベニア州 18966、チャーチビル、グリーン・ドライブ 58

㉖ 出 願 人 イミュニコン・コーポレーション アメリカ合衆国、ペンシルベニア州 19006、ハンティングトン・バレー、メイソンズ・ミル・ビジネス・キャンパス 1310

㉗ 代 理 人 弁理士 桑原 史生 外1名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

1. 再懸濁可能なコーティングされた磁気粒子の製造方法であって、
  - a. 磁性を持つ生成開始前の粒子溶液混合物を形成し、上記磁性を持つ生成開始前の物質の粉砕された粒子にコーティング形成が可能であるような特性を持つ物質をコーティングする工程
  - b. 上記磁性を持つ生成開始前の物質を細分化された粒子の混合物にするよう処理する工程
  - c. 上記工程b. と同時に、上記磁性を持つ生成開始前の細分化された粒子に再懸濁可能なコーティングを形成させる工程
  - d. 液体混合物から再懸濁可能なコーティングされた磁気粒子を回収する工程よりなることを特徴とする再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
2. 上記液体混合物が水性懸濁物である、請求項1に記載の磁気粒子の製造方法。
3. 上記磁性を持つ生成開始前の物質が遷移金属酸化物である、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
4. 上記遷移金属酸化物がマグネタイトである、請求項3に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
5. 上記コーティング物質が天然又は合成のポリマーである、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
6. 上記コーティング物質がポリペプチド、蛋白質又は抗体である、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
7. 上記混合物が照射、振動、pH変換又は超音波処理を受ける、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
8. 上記混合物が超音波処理を受ける、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
9. 上記コーティングされた粒子の最大径が0.2ミクロン以下である、請求項

- 1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
10. 上記コーティングされた粒子の最大径が0.1ミクロン以下である、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
11. 上記磁性物質と上記コーティング物質との重量比が1000:1~1:10の範囲内である、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
12. 上記再懸濁可能なコーティングされた粒子が高磁場勾配分離法により回収される、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
13. 上記工程c. における懸濁物質を、コロイド状のコーティングされた磁気粒子、コーティングされた磁気粒子の微小凝集物、及び磁気粒子に反応しないコーティング物質に分別することにより、上記コーティングされた磁気粒子を回収する、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
14. 上記分別が高磁場勾配分離法によって行われる、請求項13に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
15. 更に、上記コーティングされた磁気粒子を水中又は水性バッファー溶液中に再懸濁させる、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
16. 上記再懸濁が超音波処理して行われる、請求項15に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
17. 上記コーティングされた磁気粒子をコーティングに特異な二機能作用を有する化合物を反応させる、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
18. 上記コーティングされた磁気粒子を主に粒子内結合を形成するよう適応された二機能作用を有する化合物と反応させる、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
19. 上記コーティングされた磁気粒子と上記二機能作用を有する化合物と反応させる工程、及び生成粒子と二機能作用を有する配位子を反応させる工程を含む、請求項1に記載の再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
20. 上記コーティングされた磁気粒子と活性化剤を反応させる工程、及び生成粒子と二機能作用を有する配位子を反応させる工程を含む、請求項1に記載の

再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。

21. 再懸濁可能な磁気粒子の安定した懸濁を生成する方法であって、
  - a. 磁性を持つ生成過程開始前の粒子状物質と、上記粒子状物質の破砕された粒子を安定化することのできるような特性を持つコーティング物質との液体混合物を形成する工程
  - b. 上記液体混合物を超音波処理し、上記磁性を持つ生成過程開始前の粒子状物質を細分化する工程
  - c. 上記工程b. と同時に、上記磁性を持つ生成過程開始前の細分化された粒子状物質をコーティングし、安定した懸濁を形成する工程
 よりなることを特徴とする再懸濁可能な磁気粒子の製造方法。
22. 請求項1に記載の方法によって製造される、磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子。
23. 磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子の懸濁物を高磁場勾配分離法によって分別する方法。
24. 更に、同調された磁場を加える、請求項23に記載の方法。
25. 非フェライトの超常磁性核とポリマー物質のコーティングとを有してなることを特徴とする磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子。
26. 上記ポリマー物質のコーティングが多種類又はその誘導物質よりなる、請求項25に記載の磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子。
27. 核が少なくとも二種類の異なる遷移金属酸化物からなり、コーティングされた状態において平衡状態で白色を呈することを特徴とする、磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子。
28. 上記遷移金属がDy、Er及びVよりなる群から選ばれ、請求項27に記載の磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子。
29. 上記遷移金属酸化物が、DyとVとの酸化物、VとErとの酸化物及びDyとErとの酸化物よりなる群から選ばれ、請求項27に記載の磁気応答性のあるコーティングされた微小粒子。

#### 特許(内容に変更なし)

##### 明細書

再懸濁可能なコーティングされた磁気粒子及び安定した磁気粒子懸濁物

この特許出願は、係属中の1988年9月16日付アメリカ合衆国特許出願第245,351号の部分継続出願であり、該部分継続出願は、現在アメリカ合衆国特許第4,795,698号となっている1986年9月16日付特許出願第906,521号の継続出願であり、該継続出願は、現在は放棄されている1985年10月4日付特許出願第784,863号の部分継続出願である。上記関連出願の開示内容は本明細書において参照される。

##### 発明の分野

本発明は、特に生化学および生物学的活性にとり、磁気粒子の安定した懸濁とコーティングされた磁気粒子の再懸濁に関するものであり、そのような粒子の構成物質にも関連し、またそれらの生成と使用にも関連している。生物学的に活性化している磁気粒子はいろいろな調製技術あるいは診断技術にその使用例が認められる。これらのうちには、高磁場勾配磁気分離法(HGMS)があり、それは懸濁物から磁気粒子を磁場により分離するものである。これらの粒子が、対象となる生物学的物質に吸着しているような例では、対象となる物質を磁気粒子と結合していない他の物質から分離することが可能であろう。さらにこれらの粒子は磁気的性質のため、磁気共鳴イメージングのコントラスト剤としての機能も備えるものである。

ここで「再懸濁可能な、コーティングされた粒子」とは、固体の微小粉末状物質がコロイド懸濁を形成し、懸濁物から分離可能であり、また再び懸濁可能であることを意味する。「磁気的」とは、永久的に磁化しているものとそうではないものを包括した言葉であり、常磁性および超常磁性を含み、磁場中で応答を示す、即ち、磁気応答する物質をさし示す。「粉砕された」粒子とは、微小すぎて完全な磁区をもちえない粒子であり、いいかえれば、磁気モーメントによるエネルギーよりブラウン運動による方が大きいような粒子のことである。一般的にこ

30. 平均直径が50~500ナノメートルの範囲内にあり、部分的にイオン化されたマグネタイトの核と、該核に吸着される反対電荷を有するポリマー物質よりなるコーティングとからなることを特徴とする、超常磁性的応答性を有するコーティングされた微小粒子。
31. 高磁場勾配分離器中で磁気粒子を固定し、必要な反応物を加え、該反応物と該粒子を近傍に保ち、反応生成物を洗浄することを特徴とする、コーティングされた磁気粒子を適当な反応物と反応させる方法。

れらは0.03マイクロン以下のサイズを持つ粒子である。

##### 関連技術の説明

多くの先行技術が磁気粒子あるいは有機磁気物質の調製に対して提案されてきた。一般的にそのような粒子は、三つの範疇にはいる。即ち、大、小、そして小粒子の微小凝集である。大きな磁気粒子とは、直径が10マイクロンより大きいものであり、弱い磁場や磁場勾配に反応する。その大きなサイズのため、溶液から早く沈降する傾向にあり、単位質量あたり限られた表面積をもつ。大粒子は磁場にさらされた後は、永久的に磁化するため、粒子同士集まる傾向が強い。小粒子とは磁気核の平均直径が0.03マイクロンより小さいものであり、ブラウン運動エネルギーによって溶液内にとどまり、自発的に沈降することはない。そのような小粒子の微小凝集は各種の方法で生成される。微小凝集のサイズにも依存するが、妥当な時間、溶液中にとどまるような物質を調製することが可能である。ちなみに、小磁気粒子や小磁気粒子の微小凝集物の磁気的性質は、永久磁化可能な大粒子のそれとは著しく異なる。小磁気粒子は、酸化鉄のような強磁性物質の単結晶あるいは、強磁性物質の結晶の大きさが300Å以下になるときに「超常磁性」となるものからなる。超常磁性は、強磁性結晶とは異なり、磁場中でのみ磁化されるが、永久磁化はされない。そのような物質は、分散可能な磁気酸化金属または磁気応答粒子としてこれまでに他でも引用されてきたものである。

生物学的受容体をもつ磁気粒子を得る方法は、ギアズバーによるアメリカ合衆国特許第3,970,518号および第4,018,886号があるが、吸着による磁気粒子への物理的なコーティングを明確にしたものである。直径1マイクロンのニッケル粒子へのウシ血清アルブミンのコーティングが典型的な具体例として上げられよう。

センエイらのアメリカ合衆国特許第4,230,685号はアメリカ合衆国特許第3,970,518号の教示を考慮し、「コーティングされていない磁気粒子が抗体と効果的に結合できるという文献証拠はない」とし、さらに他の生物学的受容体の場合でもおそらく同様であろうとしている。ホワイトヘッドらのアメリカ合衆国特許第4,554,088号は酸化鉄に吸着された抗体は、1モル

の塩化ナトリウム溶液中で50℃に保温すると24時間でほとんど脱離すると述べ、また吸着された物質も少ないと述べている。

この特許で記述されている超常磁性粒子の一つ、すなわち、コロイド粒子に関してであるが、アメリカ合衆国特許第3,970,518号および第4,018,886号で提案された回収法は、そのようなコロイド粒子に対しては効きが悪い。即ち、吸着されていない物質を洗い流すために粒子を捕獲、固定するのに必要な磁場の強度が非常に大きくなければならないという理由からである。加えて、使用された装置では、そのような要求される磁場勾配に到達不可能であったとしている。調製時における高磁場勾配の使用ということに関連して言えば、ギアエバーの概念が、抗体あるいは生物学的受容体をそのような粒子に吸着させ、その状態を保つような方法として役立つようである。

吸着により機能的に十分受け入れられる粒子の生成の明らかな失敗という点では、いくつかの創意工夫が報告されている。これらにはセンエイラによるアメリカ合衆国特許第4,230,685号があり、これはマグネタイト、アルブミンそしてたんぱく質Aを含む微小球調製法の明細である。センエイラによる調製法は、上述の成分の重合化に関するものである。ホワイトヘッドらのアメリカ合衆国特許第4,554,088号は、磁性酸化金属のシラン化により生物学的活性分子が共有結合可能であるとする、超常磁性粒子の凝集を取り扱ったものである。従って、上述の両方の先行技術が凝集物質が磁気応答するものとして区別可能であろう。他の興味のあるアメリカ合衆国特許としては、ロビンソンらによる第4,152,210号、ケネディーらによる第4,070,246号そしてチュルリンスキーによる第4,454,234号があげられる。これらの特許は、すべて磁気生物学的粒子の調製あるいは使用を明細したものであるが、どの一つとも、本発明とは類似性はないと考えられる。

モルディーによるアメリカ合衆国特許第4,452,773号は、非イオン性の多量類による、25重量%の多量類溶液中での「コロイド状」酸化鉄のコーティングの形成を明細している。モルディーはさらに、よく知られた化学結合法による生物学的活性分子の共有結合を説明している。オーウェンらのアメリカ合衆国特許第4,795,698号は、その参考文献とともに、共有結合体とはなっ

た量%のデクストラン溶液は、その豊富な水酸基グループと水との作用によってできる多くの水素結合に帰因することができ非常に大きな粘性に富むということである。これらの要因は、拡散を抑制するように働く。これにより、第一鉄イオンあるいは第二鉄イオンと塩基との反応により、局所的な結晶核成長場所が形成され、その成長はイオンと近接したものだけが関係する。デクストランの存在は、従ってイオンの酸化を制限し、結果として、デクストラン分子を表面に吸着できるように小さなマグネタイト結晶(300Å以下)を形成することになる。この断言によると、デクストランは、この調製過程においていくつかの役割を果たしていることになる。モルディーによるデクストランマグネタイトの形成の別の機構説明としては、マグネタイトの基本的性質に関わるものがある。ホワイトヘッドらの電子顕微鏡学およびセンエイラの記述的な文献からは、通常の酸化鉄の塩基沈殿によって生成されるマグネタイトは、サイズが300Åかそれ以下の安定した結晶から構成されることが分かった。マグネタイトが安定したコロイド分散になり得るという報告をした文献がないことから、これらの結晶は、相互的に引き合う分子間力によって強く凝集するようである。反対に、モルディーによって使用された高濃度のデクストランから結晶を自然に、または一定の狭い場所に限って成長させ、各々の狭い場所の間に「壁」をつくると、壁は結晶上にくずれるようにコーティングされる。このことから、モルディーは、コロイド的に安定した磁気粒子の作製に成功したように思われる。ギアエバーの物質とは対照的に、各々の磁気結晶によって提供される接触表面積における相違という観点からは、モルディーは、ある多量類に対しての吸着の問題を偶然に理解したように思われる。モルディーのアメリカ合衆国特許第4,452,773号は、25重量%多量類溶液中での非イオン性多量類によるコーティングがされるコロイド状酸化鉄粒子の生成を明細したものである。モルディーはさらにそのように形成された粒子への生物学的に活性な分子の共有結合を説いている。

オーウェンらのアメリカ合衆国特許第4,795,698号は本特許出願の二世代前になるものであり、ここでも参考文献としてあげられているが、それは遷移金属酸化物と(a)ポリマーやたんぱく質のような生物学的に活性な成分または(b)生物学的に活性な化合物に対する配位子の共沈による、コロイドサイズ

のない不対電子を相当数含んだポリマーやたんぱく質による、コロイドサイズの酸化金属粒子への、共有結合によるコーティングを説いている。抗体や酵素のような生物学的に活性のある分子では、次のようなオーウェンらの調製過程では活性は失われない：(1)遷移金属酸化物溶液を多少アルカリ性pHにし、それに、0.1-1mg/mlのポリマーあるいはたんぱく質溶液を添加して共沈させ、(2)引き続き、共沈物の洗浄および(3)適当なバッファー溶液での再懸濁そして中程度の超音波処理によってコロイド状磁気応答粒子にすること。この過程において、ポリマーあるいはたんぱく質の大部分は共沈する。オーウェンらの方法によって、デクストランでコーティングされる粒子の調製を試みたが、再懸濁可能なコロイド粒子は得ることができなかった。この結果と、(デクストランやモルディーが教える他の不活性な多量類とは対照的に、)明らかに遷移金属と直接作用する不対電子を相当数もつポリマーとの共沈を必要とするというオーウェンの結果から、モルディーとオーウェンらの過程はかなり異なるものであることが示されよう。さらにオーウェンらの過程においては、たんぱく質やポリマーは、水やイオン強度の弱いバッファー溶液としなければならないことに注目しなければならない。

第一鉄イオンあるいは第二鉄イオンとデクストランとの間の明らかな作用の不在およびモルディーによるデクストランコーティング粒子の性質という点からは、そこで教えられている調製過程を検討することは意味がある。モルディーによるコロイド粒子は、塩化第一鉄あるいは塩化第二鉄と25重量%のデクストランT-20(ファーマシア社製)の水溶液あるいは同濃度の多量類水溶液とからマグネタイトを形成することにより調製される。この過程では凝集物が形成され、それは、引き続き低いG-力での遠心分離を三度行って取り除かれた。表面浮遊物のコロイド状デクストランマグネタイトは、反応しなかったデクストランをコロイド粒子から分離するためのゲルのフィルターによる濾過を行い、濾過されなく残留した方を回収して得られた。コロイド状粒子が形成された後でも相当数の自由デクストランが残った。コロイド状デクストラン形成の機構についての議論はないが、デクストランはこの過程において物理的つまり、「障壁」的な役割を果たすと考えられることは十分理解できる。この考えの基礎になることは、25重

で再懸濁可能な、生物学的に活性な磁気粒子の調製を教えるものである。

NMR(あるいはMRI)イメージングに対して、生物学的に活性な磁気応答粒子のサイズ的重要性は、例えば、レンショウ、オーウェン、エバンス、リーによるMagnetic Resonance Imaging 351(1986)に記述されている。

バベルのアメリカ合衆国特許第3,215,572号では、ロケット燃料における磁気粒子のコロイド分散を明細している。そのコロイド分散は、直径0.25マイクロンより小さく、恐らく、0.1マイクロンより小さいマグネタイト(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)磁気粒子を含むとされている。分散は「細分化過程において小さな粒子の凝集または増着」を防ぐためのグラインド剤によって、推進燃料中の大きなサイズの磁気粒子の懸濁物をボールミルすることにより調製される。ボールミルには金属球がはいっており、これにより細分化される。グラインド剤は、代表的にはオレイン酸を大体2%まで、10%までは可能に含み、更に「他のグラインド剤、例えばステアリン酸やセチルアルコールも磁気的推進剤の調製に利用可能で、またベーズン、エタン、ヒドラジンおよびガソリンと同様な表面張力をもつ他の長い鎖状の炭化水素は粒子担体そして磁気的推進剤のおもな構成成分として利用可能である(第4欄、5-6行)」。

#### 発明の総括

本発明は、磁気応答する超常磁性粒子の簡便化された調製法に関するものである。磁気応答する金属酸化物へのコーティング過程が、結晶凝集物を粉砕する過程において同時に効果的に可能である。広範囲な物質(デクストラン、たんぱく質、合成ポリペプチド、ポリマー、共重合体、洗剤そしてそれらの組合せ)によって、そのようなコロイド構成物の磁気粒子である結晶へコーティングが可能である。コロイド粒子を得ることに加えて、さらに、コーティング物質の量を制限することにより、非常に効果的に物質の吸着状態を維持し、簡単な実験的磁石により溶液から分離可能である、安定した微小凝集物を得ることが、大部分の実験例で可能である。

本発明に従えば、安定化のために(特に、生化学的あるいは生物学的に活性な)

コーティングをした（一般的に粒子の最大のサイズが0.2マイクロン以下の）小さなサイズの磁気粒子が生成されるが、それにはまず（凝集と信じられる）幾分大きなサイズの親磁気粒子と、親粒子を細分化してできる「小粒子」へのコーティング物質との懸濁物を形成することからは始めて、可能になる。この混合物に対してコーティングが同時に行なわれるように、細分化された状態を保つよう処理される。結果として生成されるものは安定した懸濁物である。

適切なコーティング物質を選択すれば、コーティングされる細分化された粒子は、分離して再懸濁可能である。この結果として得られる再懸濁可能な物質は、もし、安定化のためのコーティングが生物学的活性化合物あるいは配位子であれば、特にMRIのコントラスト剤として生物学的分析応用また産業上の生化学工程にたいして役立つであろう。

懸濁中での生成開始時の物質である親磁気粒子を細分化する方法としては、超音波処理がよく用いられる。しかし他の機械的あるいは化学的方法もまたよく用いることができる。他の「方法」としては、例えば、熱処理や照射のような粒子にエネルギーを加える方法、そしてpH交換のような化学処理あるいはこれらの方法の組合せが含まれる。特にpH交換と超音波処理の組合せもまた使用可能であろう。

#### 発明の詳細な記述

磁気化合物は、粒子の形状では大きな表面積をもつと仮定されてきた。そのような物質の結晶の凝集により、表面積の総和は最小になる。結晶が細分化された場合は、それらは不安定になる傾向がある。本発明に従えば、細分化によって生じる（そしておそらくは帯電している）表面へ、親粒子が細分化されると同時にコーティングすることにより粒子を安定化させることができる。この目的のためにコーティング物質は、凝集された磁気粒子の表面積に適合する傾向に対して選択することができ、各々のコーティング物質は、異なる磁気粒子物質に各々異なる反応をすることになる。もし細分化の技術がpH交換であるか、あるいは、それが含まれる場合は、細分化された表面積およびコーティング物質の極性に対するpH交換の効果もまた考慮できるであろう。コーティング物質は、細

分化された粒子表面への付着あるいは吸着能力に応じて各々の場合に対して選択され、サイズの小さくなった粒子の安定性が保たれ、安定した懸濁物を形成させるようにしなければならない。

本発明は、従来の簡単な方法を越えるコロイド物質の調製であり、モルディーやオーウェンらによる生成過程よりも重要な、際立った特徴をもたらす。例えば、もし、（抗体や酵素のような）二次的に付着している化合物に対して反応性の強いグループあるいは活性化されたあるグループ中のある化合物を金属化合物に付着させたい場合では、モルディーやオーウェンらの方法ではそのような化合物の選択には制限がある。これは彼等の方法は、そのような化合物と塩化鉄を混合することから始まるが、塩化鉄が化合物と反応して酸性pHを生じしてしまうためである。さらに通常は、アンモニウム水酸化物である塩基が金属化合物を形成するために必要であるが、それは二次的に結合させる活性化化合物のグループのいろいろなものに否定的な効果を持つ。本発明のような直接吸着法によれば、そのような制限は存在しない。さらに、本発明のコーティングは無水状態で可能であるが、水は全体からみればわずかな成分であるような条件下で可能である。ある場合には、コーティング物質は限られた水溶性を持つことも可能である。

パベルの特許において提案されたような長い鎖状の炭化水素のようなコーティングでは、洗剤効果がある。これらのコーティングは細分化されて凝集していない磁気粒子を安定化させ、パベルが教えているような安定した懸濁物を生成する。本発明に従えば、これらの懸濁物は、パベルによるボールミル法より数十倍から数百倍早く粒子の細分化が可能である超音波処理により、マグネタイトから生成可能である。

再懸濁可能な生成物のためにはコーティング物質の選択が重要であるが、これは細分化された磁気粒子を安定化させるのみならず、粒子が懸濁物から分離されても、コーティングが剥れないようにするためにも大切である。しかしながら、パベルによるものはこの限りではない。本発明での調製開始前の磁性化合物としては、遷移金属化合物、硫化物、ケイ素化合物、そして炭化物などがあげられる。また一つの磁性化合物中に異なる遷移金属も用いることができる。例えば、 $Gd, Fe, O_2$ がそうである。磁性化合物の一群として知られているものに、一般

的に $MO \cdot Fe_2O_3$ で表記されるフェライトがある。ここでMは、特殊なマグネタイト（ $FeO \cdot Fe_2O_3$ ）中のZn、Gd、V、Fe、Ni、Cu、Co、Mgである。

オーウェンらの教える遷移金属に加えて、鉄を含まない磁性金属酸化物の一群も、本発明で記述したコーティング物質として使用可能である。これらは次の二種類かそれ以上の組合せである： $Al (+3)$ 、 $Ti (+4)$ 、 $V (+3)$ 、 $Mb (+2)$ 、 $Co (+2)$ 、 $Mo (+5)$ 、 $Pd (+3)$ 、 $Ag (+1)$ 、 $Cd (+2)$ 、 $Gd (+3)$ 、 $Tb (+3)$ 、 $Dy (+3)$ 、 $Er (+3)$ 、 $Tm (+3)$ 、そしてHg (+1)である。これらは外見も帯磁率もフェライトとは異なるものである。非フェライト物質の色は、白色から黄色、緑色さらには茶色にまでいかなる色でもとりうる。これは、特に、分光測光学的応用には有益である。非フェライトは、一般的にフェライトより磁性が弱く、それゆえ選択的物質回収として、フェライトが基本の物質の回収が可能である磁場中でのHGMSフィルターを使用して通過してしまう。

非フェライト酸化物は、ホワイトヘッドらによって記述された金属酸化物の代わりに、そこで記述されているような好ましい性質をもつシランコーティングされた磁気粒子を生成するために用いることができる。同様にモルディーやオーウェンが教える方法とともに、そのような物質の塩化物（あるいは硫化物）の組合せが用いられると非常に好ましい磁性的、分光学的性質をもつコーティングされた生成物を得ることが可能である。

上で示したように、コーティング物質は、水溶性懸濁物すなわち水溶液で特に好んで使用されるが、非水溶液や溶解物もまた使用可能である。コーティング物質は通常は合成あるいは天然のポリマーであり、たんぱく質や核酸もまた使用可能である。

これらの物質は、液体混合物中で組み合わせられるが、通常は水のような第三の成分を含めて懸濁を形成する。これらの物質の混合物内での相対比はそれほど重要ではない。しかしながら、通常は磁気粒子対コーティング物質比は100:1から1:10（重量比）である。

磁性物質のコーティングされた粒子で安定した懸濁物を作るためには、混合物

を調製開始前の親粒子を粉砕あるいは細分化するように混合物をいろいろな方法で処理することが必要である。この方法には熱、振動、照射、超音波、pH交換のような機械的あるいは化学的方法またはこれらの組み合わせが含まれる。これらのうち超音波がとくに好ましい。

このような粒子の生成時に高磁場勾配分離（HGMS）が使用されたので、従来では達成あるいは認められなかったような生成物をも可能にすることが発見された。モルディーやオーウェンらの方法は、遠心分離やゲル濾過あるいは「塩析」法がコロイド物質の生成過程での操作手続きに対して利用される。この中で例では、HGMSが、結合しなかったコーティング物質からコロイド粒子を分離するために用いられる。そのような粒子に化学的に物質を結合させることが望ましい生成過程の場合は、HGMSの使用は、容易な規模のスケール化そして効果的な生成過程をもたらす。

HGMSは、同調された磁場中で帯磁率/粒子体積比に基づいての分別過程に能率よく使用することが可能である。これにより、便利な分別法そして離散のサイズの粒子の調製生成物が可能である。NMRコントラスト剤として使用される時は、粒子サイズが生体の代謝の結果において重要な役割をする。HGMSは、同調された磁場とともに、磁気応答する粒子核が、混合物の他の化合物より大きな帯磁率をもつ遷移金属酸化物を含む粒子を選択的に捕獲するために用いられる。この概念は、異なる帯磁率と同様に、異なる生受容体をもつコロイド粒子をサンプルと混合し、引き続いて、磁場勾配の強度を増加させて取り除くようなサンプル系での方法でもあり得る。

HGMSは、吸着されなかったコーティング物質や反応しなかった物質からコロイド粒子の副産物を取り除くのに用いられるばかりでなく、コーティングされた磁性生成物を固定化するためにも、そして固定化した物質上で反応をさせるためにも用いられる。従って、もしコーティングを化学的に変えたい場合は、磁気的に固定されている状態で起こる反応および余分な反応物あるいは容易に洗浄できる他の反応生成物のような、反応物を磁気的に固定されている物質に加えることができる。固体担体上になされるペプチド合成に多少似ているこの概念は二次的反応によく役立つ。

次の実験例は本発明の基本原理解を説明するが、それらの例の範囲はこの発明の範囲を制限するものではない。

#### 例1

この実験に使用されたすべての反応剤と化学物質は分析用等級であり、特に明記しないかぎり、フィッシャーサイエンティフィック社（パレーフォー、ペンシルベニア）から入手したものをを使用した。マグネタイトは、塩化第二鉄六水化物と塩化第一鉄四水化物の溶液を各々3.0と1.5mg/mlずつ混合し、NH<sub>4</sub>OHを用いてpHを8.6まで上げながら室温で攪拌して調製された。結果として生じたマグネタイトは磁氣的に収集され、蒸留水で三回洗浄され、蒸留水中に再懸濁させた。このように調製されたものは1.5mg/mlのマグネタイトを含む。超音波処理（フィッシャーソニックデスメンブレイター・モデル300）を70%の出力電力で3分間ほど施しても、これらの調製物は2分間以上は懸濁してない。

本発明法によって磁気粒子をコーティングするために、いろいろな濃度の各種コーティング物質の水溶液0.5mlと、1.5mg/mlのマグネタイトを懸濁させた溶液0.5mlを混合した。サンプルは、円筒形のプラスチック製の遠心分離器チューブ中で混合され、続いて、室温で70%の出力電力で3分間超音波処理を行った。コーティングが行われた証拠あるいは部分的にそうであることはサンプルによって光散乱されることを肉眼で観測することで明らかである。

コーティングの効率の決定のために、残ったサンプルはさらにどのように落ち着くか観測され、またさらにコーティングされたコロイド・マグネタイトあるいは微小凝集物を部分的に形成した、12×75mmの試験管中の超音波処理後の水溶液0.5mlをシバ・コーニング磁気分離装置にかけ、観測した。コーティングされたマグネタイト結晶がコロイド状態にあることの基準は、残された物質が溶液の状態を10分間磁気分離装置内で保つ、即ち、磁氣的浮遊物状態を保つことである。この基準は、オーウェンらによる生成過程によって作られた、たんばく質がコーティングされたコロイド状マグネタイトの溶液がその時間では磁気分離装置によって磁氣的に分離されなかったということによる。磁気分離装置内

の試験管の側面に引かれるような、安定したコーティングがされ、しかし凝集した物質を、混合物がどのくらいの割合で形成するかを決定するために、そのように形成された物質は20ミリの濃酸溶液で3度洗浄され、同じバッファー溶液中に再懸濁された。それらの再懸濁物の特性はコーティングされていないマグネタイトの場合と比較して非常に異なる。これは、前者は数時間懸濁を保つが、後者は数分間しか保つことができないためである。

磁性浮遊物を調べる第二の基準は次のようである：母液からHGMS、洗浄そしてバッファー溶液中の再懸濁により分離された、推定されるべきコロイド物質はコロイドの外見と安定性を肉眼で観測した。HGMSは（マックマスター製、ニューブロンズウィック、ニュージャージー）の20mgの細粒のステンレススチールウールを（洗剤で洗い、1%BSAリン酸バッファー含塩物（PBS）で保温し、脱イオン水ですすぎ、乾燥させ、約3mm長に切り）12×75mmの試験管に入れた。調べるべき浮遊物100マイクロリットルがステンレススチールの入った試験管に加え、磁気分離装置に2分間かけた。その時間内では磁性物質はステンレススチール線に集められた。透明な非磁性の表面浮遊物がバスター製毛細管ピペットにより取り除かれ、磁性物質は300μlの20ミリのリン酸（pH7.5）によって3度洗浄された。3度目の洗浄後、集められた磁性物質はリン酸バッファー溶液中に再懸濁され、磁気分離装置からはずして安定したコロイドの出来具合を肉眼で観測した。

ある場合には、回収された物質はまたレーザー光散乱（コルターサブマイクロ粒子分析器N4CD、ヒアリー、フロリダ）によって大きさを測定した。表面浮遊物のあるものは、セファクリル300（ファーマシア社製）上のゲル・フィルタークロマトグラフィーあるいは超ゲルACAにより、吸着していない物質から分離した。

表Iにコーティング実験において、使用された化合物、それらの濃度および他の溶液状態が示されている。上述した過程で生成されたコロイド物質と凝集物質の存在および判定量的な決定は、既知のコロイドと凝集物の混合物を標準として、それを肉眼で比較することにより行われた。要からわかるように、テストされた全ての混合物はある程度の量の安定したコロイド物質を作る。柱において、HG

MSおよび磷酸バッファー溶液中での再懸濁に続く安定性を示した。全ての場合、コーティング実験の成功は、超音波処理直後に光散乱あるいは溶液の明らかな「輝き」から決定することができよう。対照的にコーティング状態が不適当な（即ち、安定した細分化された粒子が生成されない）物質は純く不均一な外見を示す。

表 I

表面浮遊コーティング物質および濃度（重量%）	コロイドパーセント	HGMS回収	コロイド再懸濁処理状況
デクストラン, 25 %	100 %	優	優
デクストラン, 12.5 %	50 %	優	優
デクストラン, 6.25 %	25 %	不定	不定
デクストラン, 3.12 %	5 %	不定	不定
SDS, .5 %	5 %	不定	不定
SDS, .25 %	20 %	不定	不定
SDS, .125 %	80 %	優	不良
SDS, .063 %	50 %	不定	不定
ツウィーン-20, 1. %	20 %	優	良
ツウィーン-20, .5 %	30 %	不定	不定
ツウィーン-20, .25 %	40 %	不定	不定
ツウィーン-20, .125 %	50 %	不定	不定
ツウィーン-20, .063 %	75 %	不定	不定
ツウィーン-20, .031 %	90 %	不定	不定
ツウィーン-20, 3.5 %	50 %	不定	不定
BAS, 1. %; 50mM P	95 %	優	優
BAS, 7.5 %; 50mM P	80 %	不定	不定
BAS, 7.5 %; 40mM P	75 %	不定	不定
BAS, 7.5 %; 30mM P	50 %	不定	不定
BAS, 7.5 %; 20mM P	90 %	不定	不定
BAS, .25%; 0.16Mツウィーン-20	95 %	優	優

1 g G (ヒト) .	5% : PBS、50%	60 %	優	優
脱脂ヒト血清		100 %	優	優
G α MFc/50mM P 1 : 2		5 %	不定	不定
G α MFc/50mM P 1 : 4		50 %	不定	不定
G α MFc/50mM P 1 : 8		5 %	不定	不定
G α MFc/50mM P 1 : 16		30 %	不定	不定
G α MFc/50mM P 1 : 32		20 %	不定	不定
G α MFc/50mM P 1 : 64		5 %	不定	不定
生のスチロイド無し.				
脱脂血清		5 %	不定	不定
スチロイド無し.				
脱脂血清/50mM P(1:128)		50 %	不定	不定
P E G.	20 %	80 %	不定	不定
G L A.	10 %	100 %	不定	不定
p o l y G.	10 %	15 %	不定	不定
ポリビニール ピロリジン.	15 %	75 %	不定	不定
ポリビニール アルコール.	10 %	50 %	不定	不定

の程度よく吸着されたかを決定するために、回収された物質を室温で40分間pH3.0の0.1モルのグリシンに懸濁させ、磁気分離し、20ミルモルの換酸バッファー溶液で一度洗浄した。実験条件1、2ではカウント数としては各々91%、84%残留した。同様に調製されたものをバッファー溶液中に再懸濁させ、さらに、37度で一晩保存すると、マグネタイトに吸着される物質はなくなった。

コロイドマグネタイトBSAの安定性をみるために、コロイドに吸着したBSAの量を次のように定量化した。すなわち $3 \times 100 \mu\text{l}$ の表面浮遊物の水溶液が各々HGMSによって集められ、 $300 \mu\text{l}$ の燐酸バッファ溶液で二度洗浄され、同バッファ溶液 $100 \mu\text{l}$ に再懸濁させた。16時間以上にわたる観測からコロイド物質が安定であることは明らかであった。HGMSによって回収された放射性BSAは、全体の表面浮遊物に対して5,400cpmであった。放射線計測と条件2で得られた表面浮遊物と凝集物質の体積から、マグネタイトには7,828cpmが吸着したと決定された。この量は加えられたBSA全体の0.01%であり、約 $0.75 \text{ mg/ml}$ のマグネタイトに吸着され、コーティング粒子が生成したことになる。この値はオーウェンラに生成手続きによるマグネタイトへのBSAコーティングの最適値に非常に近い。

1 g コーティング実験は、PBS/2 (1:2の割合で水を希釈したPBS)中に5%のたんぱく質濃度で行われた。超音波処理前に、混合物に $1.8 \times 10^6$  cpm放射性ラベル化されたIgGを加えた。これらの実験では、加えたたんぱく質の1.2%が吸着されたことになる。これはまたオーウェンらの数値に近い。この実験の磁気的界面浮遊物にHGMsを施した結果、23,000 cpmがコロイド物質に残留したことがわかった。凝集した磁性物質の顆粒には数回の洗浄後で17,300 cpmが残留した。磁性顆粒がpH3.0のグリシン中に懸濁された場合、この後に得られる顆粒状磁性物質には50%の計数値しか残留しなかった。しかしながらこの実験では、微小凝集物質のグリシンによる処理は相当な部分(約半分)をコロイド物質に変換することが分かった。従ってIgGコーティングされた物質は真に安定であることになる。HGMsによって回収されたコロイド物質は真に極めて安定であることが示された。

P = 燐酸バッファー

G α MFC = ヤギ抗ネズミFc (γ+γ2γ3b\*319-, 9x2x3\*0-7\*, ヘンシムニ7)

SDS = 酸化ナトリウム10水塩

PEG = ポリエチレングリコール (マシヤツツ、コシマツ イソ<sup>1</sup>、イシラシ<sup>2</sup>イソ<sup>3</sup>イソ<sup>4</sup>、ニ<sup>5</sup>-ジ<sup>6</sup>イ<sup>7</sup>-イ<sup>8</sup>)

デクストラン = デクストラン T-40 (7γ+マツ、b\*シラケ<sup>1</sup>-、ニ<sup>2</sup>-ジ<sup>3</sup>イ<sup>4</sup>-イ<sup>5</sup>)

poly G = ポリグルタミン酸 (NEN、A\*イロトナミ<sup>1</sup>シラ<sup>2</sup>イ<sup>3</sup>イ<sup>4</sup>イ<sup>5</sup>イ<sup>6</sup>イ<sup>7</sup>イ<sup>8</sup>イ<sup>9</sup>イ<sup>10</sup>イ<sup>11</sup>イ<sup>12</sup>イ<sup>13</sup>イ<sup>14</sup>イ<sup>15</sup>イ<sup>16</sup>イ<sup>17</sup>イ<sup>18</sup>イ<sup>19</sup>イ<sup>20</sup>イ<sup>21</sup>イ<sup>22</sup>イ<sup>23</sup>イ<sup>24</sup>イ<sup>25</sup>イ<sup>26</sup>イ<sup>27</sup>イ<sup>28</sup>イ<sup>29</sup>イ<sup>30</sup>イ<sup>31</sup>イ<sup>32</sup>イ<sup>33</sup>イ<sup>34</sup>イ<sup>35</sup>イ<sup>36</sup>イ<sup>37</sup>イ<sup>38</sup>イ<sup>39</sup>イ<sup>40</sup>イ<sup>41</sup>イ<sup>42</sup>イ<sup>43</sup>イ<sup>44</sup>イ<sup>45</sup>イ<sup>46</sup>イ<sup>47</sup>イ<sup>48</sup>イ<sup>49</sup>イ<sup>50</sup>イ<sup>51</sup>イ<sup>52</sup>イ<sup>53</sup>イ<sup>54</sup>イ<sup>55</sup>イ<sup>56</sup>イ<sup>57</sup>イ<sup>58</sup>イ<sup>59</sup>イ<sup>60</sup>イ<sup>61</sup>イ<sup>62</sup>イ<sup>63</sup>イ<sup>64</sup>イ<sup>65</sup>イ<sup>66</sup>イ<sup>67</sup>イ<sup>68</sup>イ<sup>69</sup>イ<sup>70</sup>イ<sup>71</sup>イ<sup>72</sup>イ<sup>73</sup>イ<sup>74</sup>イ<sup>75</sup>イ<sup>76</sup>イ<sup>77</sup>イ<sup>78</sup>イ<sup>79</sup>イ<sup>80</sup>イ<sup>81</sup>イ<sup>82</sup>イ<sup>83</sup>イ<sup>84</sup>イ<sup>85</sup>イ<sup>86</sup>イ<sup>87</sup>イ<sup>88</sup>イ<sup>89</sup>イ<sup>90</sup>イ<sup>91</sup>イ<sup>92</sup>イ<sup>93</sup>イ<sup>94</sup>イ<sup>95</sup>イ<sup>96</sup>イ<sup>97</sup>イ<sup>98</sup>イ<sup>99</sup>イ<sup>100</sup>イ<sup>101</sup>イ<sup>102</sup>イ<sup>103</sup>イ<sup>104</sup>イ<sup>105</sup>イ<sup>106</sup>イ<sup>107</sup>イ<sup>108</sup>イ<sup>109</sup>イ<sup>110</sup>イ<sup>111</sup>イ<sup>112</sup>イ<sup>113</sup>イ<sup>114</sup>イ<sup>115</sup>イ<sup>116</sup>イ<sup>117</sup>イ<sup>118</sup>イ<sup>119</sup>イ<sup>120</sup>イ<sup>121</sup>イ<sup>122</sup>イ<sup>123</sup>イ<sup>124</sup>イ<sup>125</sup>イ<sup>126</sup>イ<sup>127</sup>イ<sup>128</sup>イ<sup>129</sup>イ<sup>130</sup>イ<sup>131</sup>イ<sup>132</sup>イ<sup>133</sup>イ<sup>134</sup>イ<sup>135</sup>イ<sup>136</sup>イ<sup>137</sup>イ<sup>138</sup>イ<sup>139</sup>イ<sup>140</sup>イ<sup>141</sup>イ<sup>142</sup>イ<sup>143</sup>イ<sup>144</sup>イ<sup>145</sup>イ<sup>146</sup>イ<sup>147</sup>イ<sup>148</sup>イ<sup>149</sup>イ<sup>150</sup>イ<sup>151</sup>イ<sup>152</sup>イ<sup>153</sup>イ<sup>154</sup>イ<sup>155</sup>イ<sup>156</sup>イ<sup>157</sup>イ<sup>158</sup>イ<sup>159</sup>イ<sup>160</sup>イ<sup>161</sup>イ<sup>162</sup>イ<sup>163</sup>イ<sup>164</sup>イ<sup>165</sup>イ<sup>166</sup>イ<sup>167</sup>イ<sup>168</sup>イ<sup>169</sup>イ<sup>170</sup>イ<sup>171</sup>イ<sup>172</sup>イ<sup>173</sup>イ<sup>174</sup>イ<sup>175</sup>イ<sup>176</sup>イ<sup>177</sup>イ<sup>178</sup>イ<sup>179</sup>イ<sup>180</sup>イ<sup>181</sup>イ<sup>182</sup>イ<sup>183</sup>イ<sup>184</sup>イ<sup>185</sup>イ<sup>186</sup>イ<sup>187</sup>イ<sup>188</sup>イ<sup>189</sup>イ<sup>190</sup>イ<sup>191</sup>イ<sup>192</sup>イ<sup>193</sup>イ<sup>194</sup>イ<sup>195</sup>イ<sup>196</sup>イ<sup>197</sup>イ<sup>198</sup>イ<sup>199</sup>イ<sup>200</sup>イ<sup>201</sup>イ<sup>202</sup>イ<sup>203</sup>イ<sup>204</sup>イ<sup>205</sup>イ<sup>206</sup>イ<sup>207</sup>イ<sup>208</sup>イ<sup>209</sup>イ<sup>210</sup>イ<sup>211</sup>イ<sup>212</sup>イ<sup>213</sup>イ<sup>214</sup>イ<sup>215</sup>イ<sup>216</sup>イ<sup>217</sup>イ<sup>218</sup>イ<sup>219</sup>イ<sup>220</sup>イ<sup>221</sup>イ<sup>222</sup>イ<sup>223</sup>イ<sup>224</sup>イ<sup>225</sup>イ<sup>226</sup>イ<sup>227</sup>イ<sup>228</sup>イ<sup>229</sup>イ<sup>230</sup>イ<sup>231</sup>イ<sup>232</sup>イ<sup>233</sup>イ<sup>234</sup>イ<sup>235</sup>イ<sup>236</sup>イ<sup>237</sup>イ<sup>238</sup>イ<sup>239</sup>イ<sup>240</sup>イ<sup>241</sup>イ<sup>242</sup>イ<sup>243</sup>イ<sup>244</sup>イ<sup>245</sup>イ<sup>246</sup>イ<sup>247</sup>イ<sup>248</sup>イ<sup>249</sup>イ<sup>250</sup>イ<sup>251</sup>イ<sup>252</sup>イ<sup>253</sup>イ<sup>254</sup>イ<sup>255</sup>イ<sup>256</sup>イ<sup>257</sup>イ<sup>258</sup>イ<sup>259</sup>イ<sup>260</sup>イ<sup>261</sup>イ<sup>262</sup>イ<sup>263</sup>イ<sup>264</sup>イ<sup>265</sup>イ<sup>266</sup>イ<sup>267</sup>イ<sup>268</sup>イ<sup>269</sup>イ<sup>270</sup>イ<sup>271</sup>イ<sup>272</sup>イ<sup>273</sup>イ<sup>274</sup>イ<sup>275</sup>イ<sup>276</sup>イ<sup>277</sup>イ<sup>278</sup>イ<sup>279</sup>イ<sup>280</sup>イ<sup>281</sup>イ<sup>282</sup>イ<sup>283</sup>イ<sup>284</sup>イ<sup>285</sup>イ<sup>286</sup>イ<sup>287</sup>イ<sup>288</sup>イ<sup>289</sup>イ<sup>290</sup>イ<sup>291</sup>イ<sup>292</sup>イ<sup>293</sup>イ<sup>294</sup>イ<sup>295</sup>イ<sup>296</sup>イ<sup>297</sup>イ<sup>298</sup>イ<sup>299</sup>イ<sup>300</sup>イ<sup>301</sup>イ<sup>302</sup>イ<sup>303</sup>イ<sup>304</sup>イ<sup>305</sup>イ<sup>306</sup>イ<sup>307</sup>イ<sup>308</sup>イ<sup>309</sup>イ<sup>310</sup>イ<sup>311</sup>イ<sup>312</sup>イ<sup>313</sup>イ<sup>314</sup>イ<sup>315</sup>イ<sup>316</sup>イ<sup>317</sup>イ<sup>318</sup>イ<sup>319</sup>イ<sup>320</sup>イ<sup>321</sup>イ<sup>322</sup>イ<sup>323</sup>イ<sup>324</sup>イ<sup>325</sup>イ<sup>326</sup>イ<sup>327</sup>イ<sup>328</sup>イ<sup>329</sup>イ<sup>330</sup>イ<sup>331</sup>イ<sup>332</sup>イ<sup>333</sup>イ<sup>334</sup>イ<sup>335</sup>イ<sup>336</sup>イ<sup>337</sup>イ<sup>338</sup>イ<sup>339</sup>イ<sup>340</sup>イ<sup>341</sup>イ<sup>342</sup>イ<sup>343</sup>イ<sup>344</sup>イ<sup>345</sup>イ<sup>346</sup>イ<sup>347</sup>イ<sup>348</sup>イ<sup>349</sup>イ<sup>350</sup>イ<sup>351</sup>イ<sup>352</sup>イ<sup>353</sup>イ<sup>354</sup>イ<sup>355</sup>イ<sup>356</sup>イ<sup>357</sup>イ<sup>358</sup>イ<sup>359</sup>イ<sup>360</sup>イ<sup>361</sup>イ<sup>362</sup>イ<sup>363</sup>イ<sup>364</sup>イ<sup>365</sup>イ<sup>366</sup>イ<sup>367</sup>イ<sup>368</sup>イ<sup>369</sup>イ<sup>370</sup>イ<sup>371</sup>イ<sup>372</sup>イ<sup>373</sup>イ<sup>374</sup>イ<sup>375</sup>イ<sup>376</sup>イ<sup>377</sup>イ<sup>378</sup>イ<sup>379</sup>イ<sup>380</sup>イ<sup>381</sup>イ<sup>382</sup>イ<sup>383</sup>イ<sup>384</sup>イ<sup>385</sup>イ<sup>386</sup>イ<sup>387</sup>イ<sup>388</sup>イ<sup>389</sup>イ<sup>390</sup>イ<sup>391</sup>イ<sup>392</sup>イ<sup>393</sup>イ<sup>394</sup>イ

## 例2 タンパク質コーティングおよび保留の定量化

<sup>125</sup>Iでラベル化したBSAとIgGを、フラッカーおよびスベック (Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 849 (1978)) のヨウ素法によって調製した。比放射量は各々520,000cpm/μlおよび810,000mg/μlであった。BSAをマグネタイトへ次のような二通りの条件下でコーティングされた。すなわち、(1)10ミリモル燐酸バッファー溶液中で、7.5%BSAで3分間の超音波処理、そして(2)25ミリモルの燐酸バッファー溶液中の7.5%BSAで3分間の超音波処理である。両者の場合とも800,000cpmのラベル化されたBSAが超音波処理前に混合液(0.5ml)に加えられた。直視観測から、燐酸濃度が高いほど、明らかにコロイド物質の量は多くなるという結果が得られることが判明した。各々のサンプルでの実験で磁気的に収集可能な沈殿物が集められ、20ミリモルの燐酸バッファー溶液で二度洗浄され、計数された。条件1では、磁性沈殿物は各々242cpmおよび2,828cpmであった。これらの凝集された生成物にBSAが42

### 例3 生物学的活性の保持

ヤギ抗ネズミFc (ジャクソンラボラトリー社、ウエストグロープ、ペンシルベニアより入手) を例1で記述されているようにマグネタイトにコーティングされた。コーティングに対しては、処理されていない抗血清が1:4の割合で50ミリモルの磷酸で希釈された。超音波処理後、大部分の物質はコロイドとなった。表面浮遊物全体はセファクルー300により取り除かれた。取り除かれた部分内で残ったコロイド物質は回収され、次のようなテストが行われた。100μlの回収されたコロイドが100,000カウントの<sup>125</sup>Iラベル化されたネズミIgGあるいは100,000カウントの<sup>125</sup>BSAとのどちらかと混合された。これらの混合物は、上述の鉄粉入りの12×75mmの試験管中で保温された。室温で90分後、上述のようにHGMSが施され、表面浮遊物は捨てられ、集められた物質は20%BSAを含む0.8mlのPBSで二度洗浄された。(三倍に薄められた。) これらのコロイドサンプルでは平均として5,200カウントのネズミIgGがFcコーティングされたコロイドに結合し、632cpmがとくに結合していないBSAであると判明した。

#### 例4 薄色の粒子

例1で記述されたように塩基に適当な金属酸化物を加え、室温および65℃で混合物の遷移金属酸化物が生成された。表IIは調製時の条件、モル比、酸化物の初期時の色、一週間後の色そして8時間新鮮な酸素を強制通過させた後での色を示したものである。



表II  
濃度 (ミリモル/リットル)

番号	FeCl <sub>3</sub>	VCl <sub>3</sub>	CoCl <sub>2</sub>	PbCl <sub>2</sub>	DyCl <sub>3</sub>	ErCl <sub>3</sub>	初期色	最終色
1	---	5	---	---	5	---	暗緑	白
2	2.7	3.6	---	---	3.6	---	暗緑	黄
3	5	3.3	---	---	1.7	---	暗緑	橙
4	6	---	---	---	4	---	暗緑	さび色
5	---	---	5	5	---	---	緑	茶
6	---	---	---	5	5	---	茶	茶
7	---	5	5	---	---	---	青/緑	緑
8	---	5	---	---	---	5	濁茶	白
9	---	---	---	5	---	5	茶	茶
10	---	---	---	---	5	5	白	白
11	5	---	---	---	---	5	緑	橙

\*これらの酸化物の色は約一週間内で次第に変化したか、あるいは沈降物に酸漿を強制通過させた場合において約8時間内での変化である。

表IIIは、表II (調製物1、2、3、そして4) の酸化物生成物へのコーティングの結果を示している。これは、デクストランとBSAによるもので、本発明に従ったものである。明らかに、これらの物質は等しく、マグネタイトにコーティング可能である。表IIにリストされている非フェライトおよびフェライト酸化物は、ホワイトヘッドらが教える同色を呈するシランによるコーティング物質を生成するために、マグネタイトの代わりに使用可能である。これらの金属の適当な

次にマグネタイトのコーティングをオーウェンらの生成手続きに従って行くと、粒子サイズが小さくなることが判明している二通りの方法によって調製した。すなわち、塩基を急激に加える方法と、昇温(65℃)して塩基を一気に加える方法である。BSAマグネタイトが1回の超音波処理だけで、オーウェンらの方法で調製された場合、両方法ともコロイドの平均直径は50nmであった。

#### 例6 pHによる影響としてのマグネタイトの性質

ガス抜きされた、塩化第一鉄および第二鉄の各々7mg/mlと3mg/mlに3.75%のNH<sub>4</sub>OHを毎分0.6mlの割合で攪拌しながら加え、200mlまでにした。この酸性混合物のpHが7.0になってから、(これは色が暗褐色から黒色に変化することから示される)300μlの溶液を10×75mmのガラス試験管にとり、マグネタイトの存在がテストされた。このために、ネオジウム/鉄/ホウ素系合金の棒磁石を試験管の横側にあて、溶液が透明になることを直接観測した。非磁性から一部磁性あるいは全部磁性になるのはpH7.4で起こり、12.2mlの塩基が加えられた時である。この時点で、60mlの混合溶液が調製物Aとして取り出された。さらにpH8.9になるまで残りの混合溶液に塩基を加え、調製物Bとして60ml取り出された。残りの混合溶液にはさらにpH9.8になるまで塩基を加え、調製物Cとした。マグネタイト調製物A、B、そしてCは4回蒸留水で洗浄し、塩化鉄濃度が初期の溶液の場合と同濃度になるように水中に再懸濁させた。こうした後の懸濁物A、B、そしてCには70%出力電力で3分間超音波処理(フィッシャーソニックドスメンブレータ)を施した。超音波処理直後、各々には、濁ったコロイドマグネタイトが現れたが、約2分以内で全て純い懸濁物にもどってしまった。(これは粒子凝集である。)調製物Cでは、超音波処理後、20-30秒で変化が起こり、調製物Bでは40-45秒後、また調製物Aでは、2分後に変化が現れた。これらの調製物を超音波処理直後にコーニング磁気分離装置にかけると、上述した順序と時間で懸濁物から完全に透明になった。再懸濁後はこれらのサンプル間では区別可能な違いはみとめられなかった。

調製されたマグネタイトは超音波処理によって分解されやすいが、これがH<sup>+</sup>

表III  
超音波洗浄後の外觀

粒子	化学物質	表面浮遊物	顆粒	%コロイド
1	25%デクストラン	明白色	白色	90 %
2	25%デクストラン	暗黄色	白色	20 %
3	25%デクストラン	透明な黄色	白色	95 %
4	25%デクストラン	透明な褐色	褐色	50 %

1	1%BSA/50mM P	明白色	白色	90 %
2	1%BSA/50mM P	暗黄色	白色	90 %
3	1%BSA/50mM P	透明な黄色	白色	95 %
4	1%BSA/50mM P	透明な褐色	褐色	75 %

#### 例5 コロイド粒子のサイズ

BSAマグネタイトは、例1のマグネタイトおよびpH7.0の50ミリモルの塩酸中1%のBSAとにより前述のように調製された。ただし超音波処理を3分間を2回とし、そしてもう3分間を3回として施した。前述のように、磁気分離装置により凝集物を取り除いた後、結果として残ったコロイドサンプルはレーザー光散乱(コルターサブマイクロン粒子分析器)によって分析された。これにより実験誤差範囲内で平均粒子直径は80ナノメートルであることが示された。

あるいはOH<sup>-</sup>による処理によって変化するかをみるために、調製物C溶液0.5mlを試験管にいれ、磁気分離及び浮遊物吸引によって表面浮遊物を取り除いた。磁性顆粒を、0.5mlの希釈HCl(0.1、0.01、0.001、また0.0001モル)あるいは希釈NaOH(0.1、0.01、0.001、また0.0001モル)中へ再懸濁させ、3分間超音波処理し、直接観測した。0.1モルのHClあるいはNaOH中に再懸濁させ、超音波処理したものは、濁りたまま、12時間近くもコロイド状態を保った。0.001モルの酸や塩基に再懸濁されたものでも相当長い間コロイド状態を維持した。しかし0.0001モルの酸や塩基に懸濁させたものは、もともとの物質が水中で示したように、超音波処理後にすぐに凝集を起こした。

#### 例7 pH変化させたマグネタイトのコーティング

例6での調製物Cにはアニオンおよびカチオンポリペプチドとともに超音波処理により粉砕するとコーティングされた。60モル%のグルタミン酸、30モル%のアラニン、10モル%のチロジン(GAT、ロット番号M18G)から成るアニオン性のターポリペプチドと、60モル%のリジン、40モル%のアラニン(LA、ロット番号M-5B)から成るカチオン性の共重合体の両方ともバイロットケミカルズ社(ウォータータウン、マサチューセッツ)から入手したものを使用した。これらのポリペプチドはいずれも100,000ダルトンであり、適当な酸や塩基による滴定により可溶性化、中性化し、調整バッファー化した含塩物(pH7.0)に対して透析し、引き続いて蒸留水に対して透析した。コーティングは10mg/mlポリペプチド溶液と同様の一連の1/16倍液によって試みられた。このコーティング実験が行われる際には、前述の超音波処理が施された。これらの実験では、1/16倍と1/8倍のGATとLAとにより安定したコロイド溶液を生成することが可能であった。1/4倍と1/2倍そして原液のポリペプチド溶液では、コロイドと凝集物の混合物が生じた。これらの結果のいずれにおいてもコロイドの量は一般的にポリペプチドの濃度の増加とともに減少した。しかしながら25mg/mlのGATの場合は、全ての物質はコロイド状になった。

例6の生成物AとCはGATでコーティングされた。マグネタイト溶液0.5 mlを1.0 mlのHClあるいは、NaOH (0.01モルと0.1モル)に再懸濁させ、続いて0.5 mlの水による洗浄を2回行った。これらの前処理されたマグネタイトは、 $2.5 \times 10^4$  cpmの $^{51}\text{Cr}$  GAT (前述のヨウ素法による放射線ラベル化されたもの)を含む1 mg/ml GATの溶液0.5 mlに再懸濁させ、前述のように超音波処理を施した。超音波処理されたサンプルはコーニング磁気分離装置にかけられ、一晩にわたり分離を試みた。磁性顆粒は0.5モルのNaClで一度洗浄され、放射線計数された。いろいろなマグネタイトにコーティングされたGATの割合は表IVに示されている。

表IV

マグネタイト生成物AおよびCへのGATコーティングの $^{51}\text{Cr}$ /OH-処理の効果

処 理	生成物 A		生成物 C	
	cps 結合	%結合	cps 結合	%結合
0.10 M HCl	450.000	35	340.000	26
0.10 M HCl	287.602	22	226.250	17
$\text{H}_2\text{O}$ コントロール	209.165	16	236.042	18
0.10 M NaOH	130.728	10	未定	未定
0.10 M NaOH	90.600	8	54.010	5

表IVのデータから、マグネタイト結晶の表面電荷は、酸による前処理によってより陽性になり、逆に塩基による前処理により、負電荷を帯びたポリマーの結合する場所が減少する。カチオン性のターポリマー-LAT (60モル%lys、30モル%ala、10モル%tyr)、(ジェファソン医科大学、フィデルフィア、ペンシルベニアのH. J. キャラン博士より入手)の $^{51}\text{Cr}$ 処理を、同様な前処理をされたマグネタイトに使用した場合では、塩基で前処理されたマグネタイトと正電荷を帯びた物質との結合がより強くなるということが観測され

## 手続補正書 (方式)

平成 4年12月17日



特許庁長官 麻生 渡 殿

- 事件の表示  
平成2年特許願第512705号
- 発明の名称  
再懸濁可能なコーティングされた磁気粒子及び安定した磁気粒子懸濁物
- 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
名称 イミュニコン・コーポレーション
- 代理人 千102  
住所 東京都千代田区飯田橋3丁目11番5号  
20山京ビル705  
(TEL) 3237-0291 (FAX) 3237-0292  
氏名 (8558) 井理士 森原 史生
- 補正命令の日付  
平成 4年11月17日 (発送)
- 補正の対象  
(1) 特許法第184条の5第1項の規定による書面  
(2) 外国語特許出願の明細書の翻訳文 (浄書)
- 補正の内容  
別紙の通り



## 国際調査報告

International Application No. PCT/US90/04459

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER of several classification symbols apply, indicate all: According to International Patent Classification (IPC) or to other national Classification and IPC U.S.C.: 435/4; 210/222; 252/62.56; 427/2; 428/402; 435/7; 435/181; 436/526		
2. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched: Classification System U.S.C.I.: 435/4; 210/222; 252/62.56; 427/2; 428/402; 435/7; 435/181; 436/526; 436/533		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched: APS, CAS, BIOSYS		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT: Category: * Citation of Document, ** with indication, where appropriate, of the relevant passages ** Substantive Class No. **		
X Y	US, A, 4,795,698 (Nwan et al.) 03 January 1989, see the entire document.	1-10, 15-22, 25-27 11-14, 23, 24, 28-31
X Y	US, A, 4,452,773 (Molday) 05 June 1984, see the entire document.	1-7, 9, 10, 15, 17, 18, 25-26, 28, 11-14, 16, 19 20-24, 27-31
X Y	US, A, 4,554,088 (Whithead et al.) 19 November 1985, see entire document.	1-4, 22 5-7, 9-15, 20
X Y	US, A, 4,628,037 (Chagnon et al.) 09 December 1986, see entire document.	1-4, 22 5-7, 9-15, 20
A	US, A, 3,907,518 (Glanzer) 20 July 1976, see abstract.	1-21
* Special Categories of cited documents: ** "A" document claiming the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" document published on or after the international filing date "C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is used to establish the publication date of another claim or which relates to the same invention as another claim "D" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other event "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date "F" document published after the international filing date but later than the priority date "G" document published after the international filing date but later than the priority date "H" document published after the international filing date but later than the priority date "I" document published after the international filing date but later than the priority date "J" document published after the international filing date but later than the priority date "K" document published after the international filing date but later than the priority date "L" document published after the international filing date but later than the priority date "M" document published after the international filing date but later than the priority date "N" document published after the international filing date but later than the priority date "O" document published after the international filing date but later than the priority date "P" document published after the international filing date but later than the priority date "Q" document published after the international filing date but later than the priority date "R" document published after the international filing date but later than the priority date "S" document published after the international filing date but later than the priority date "T" document published after the international filing date but later than the priority date "U" document published after the international filing date but later than the priority date "V" document published after the international filing date but later than the priority date "W" document published after the international filing date but later than the priority date "X" document published after the international filing date but later than the priority date "Y" document published after the international filing date but later than the priority date "Z" document published after the international filing date but later than the priority date		
IV. CERTIFICATION Date of the Actual Completion of the International Search: 27 November 1990 International Searching Authority: ISA/US Date of Mailing of this International Search Report: 18 JAN 1991 Signature of Authorizing Officer in: SCOTT A. CHAMBERS		

Form PCT/ISA/210 (Revised March 1989)

International Application No. PCT/US90/04459

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

--	--	--

☐ **OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE?**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) for the following reasons:

☐ Claim numbers \_\_\_\_\_, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

☐ Claim numbers \_\_\_\_\_, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

☐ Claim numbers \_\_\_\_\_, because they are dispositive claims not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.1(c).

☐ **OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING?**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

I. Claims 1-22 drawn to a process of making magnetic particles and the particle made.

II. Claims 23-30 drawn to other microparticles with polymeric coating and oxide core as well as claims 31 & 32 drawn to a process of fractionating.

☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all, or at least all claims of the international application. **Telephone Practice**

☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is limited to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

☐ As all essential claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority has not drawn up a protest.

☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

From PCT/US90/04459 and (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100)

第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>

B 01 D 35/06  
G 01 R 33/30  
// C 12 N 1/02  
11/14

識別記号

Z

庁内整理番号

7726-4D

7236-4B

2121-4B

②発明者 ビノ、マリア・エイ

アメリカ合衆国、ペンシルベニア州 19147、フィラデルフィア、  
サウス・サード・ストリート 773

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**